

AUS DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK ZÜRICH

Direktor: Prof. Dr. med. W. Löffler

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. F. Koller

Über die Wirkung des Thrombins im Thrombokinase- bildungstest

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Hans Isenschmid

von Bern und Zürich

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. Löffler

und P. D. Prof. Dr. F. Koller

Zürich 1955



19

55

VERLAG VON S. KARGER AG. IN BASEL

Curriculum vitae

Am 6. Januar 1926 wurde ich in Zürich geboren. Hier besuchte ich die Primarschule und die zwei ersten Klassen des Kantonalen Gymnasiums. Die folgenden Gymnasialjahre verbrachte ich in Bern, wo ich 1945 am Freien Gymnasium die Maturität bestand.

Mit Ausnahme eines klinischen Semesters in Bern absolvierte ich das Medizinstudium an der Universität Zürich, wo ich es 1951 mit dem Staatsexamen abschloß.

Von Oktober 1952 bis Januar 1954 arbeitete ich im Gerinnungsphysiologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik Zürich (Leitung: Prof. Dr. med. F. Koller), und seither als Assistenzarzt am Bezirksspital Affoltern a. Albis.

Herrn Prof. Dr. med. F. Koller sowie meinen Kollegen am Gerinnungsphysiologischen Labor möchte ich für ihr Interesse und ihre Anregungen herzlich danken.



Aus dem Gerinnungsphysiologischen Laboratorium (Prof. F. Koller)
der Medizinischen Universitätsklinik Zürich (Prof. W. Löffler)

Über die Wirkung des Thrombins im Thrombokinasebildungstest

Von H. ISENSCHMID

Biggs, Douglas und *Macfarlane* (18) haben 1952 zwei neue Methoden ausgearbeitet, welche die Vorphase der Blutgerinnung, die Thrombokinasebildung, erfassen. In ihrem "thrombin generation test" messen sie die Thrombinbildung während der Gerinnung einer Probe reinen Vollblutes. Sie konnten zeigen, daß normalerweise eine sehr starke Thrombokinase wirksam sein muß, und fanden bei Hämophilie und Thrombopenie charakteristische Abweichungen von der normalen Thrombinbildung.

Bisher war bekannt, daß zur Thrombokinasebildung Thrombocyten, antihämphiles Globulin und eine benetzbare Oberfläche nötig sind, (6, 7, 17, 20). Im "thromboplastin generation test" mischen *Biggs* und *Douglas* Thrombocyten, antihämphiles Globulin, Serum und Calcium, inkubieren dieses Gemisch im Wasserbad bei 37° und bestimmen alle Minuten mit Hilfe eines Substratplasmas die Gerinnungszeit. So gelingt es, über die Störung der Thrombokinasebildung vor allem bei Hämophilie A, Hämophilie B (Christmas disease), bei der Hemmkörperhämophilie und bei den Thrombopathien Aufschluß zu erlangen, (2, 3, 4, 8).

Duckert und Mitarb. (9) vereinfachten die Methode des Thrombokinasebildungstestes ("thromboplastin generation test") und zeigten, daß die Faktoren V und VII für die Bildung der Blutthrombokinase wahrscheinlich ohne Einfluß sind. Auch auf die Umwandlung des Prothrombins bei Gegenwart von Blutthrombokinase haben große Unterschiede im Gehalt an den Faktoren V und VII keinen Einfluß, was einen wesentlichen Unterschied im

Wirkmechanismus zwischen Blut- und Gewebsthrombokinase darstellt. *Koller* und Mitarb. (14, 15) wiesen im Serum einen weiteren Faktor nach, der für die normale Thrombokinasebildung nötig ist. Sie nannten ihn Faktor X, nachdem *Koller* für das antihämophile Globulin den Namen Faktor VIII, und für den bei Hämophilie B fehlenden "Christmas factor" die Bezeichnung Faktor IX vorgeschlagen hatte.

Wie die meisten gerinnungsphysiologischen Meßmethoden beruht auch der Thrombokinasebildungstest auf der Bestimmung der Gerinnungszeit. Diese ist unter gewissen Voraussetzungen der wirksamen Thrombokinasemenge proportional: dann nämlich, wenn die zur Umwandlung gelangenden Fibrinogen- und Prothrombinmengen konstant sind, und wenn kein zusätzliches Thrombin im System vorhanden ist. Wie bereits die einfache Thrombin-Verdünnungskurve zeigt, können geringe zusätzliche Thrombinmengen die verlängerte Gerinnungszeit ganz erheblich verkürzen.

Als Quelle für solches zusätzliches Thrombin kommt im Thrombokinasebildungstest vor allem das Serum in Frage. *Biggs* und *Douglas* (2) verwenden deshalb das Serum erst, nachdem sie es während zweier Stunden im Wasserbad bei 37° C inaktiviert, und so das Thrombin weitgehend eliminiert haben. Wie wir mit einer einfachen Thrombin-Bestimmung feststellen konnten, sind aber in solchen inaktivierten Sera noch recht unterschiedliche, oft beträchtliche Mengen Thrombin vorhanden (s. Tab. 1).

Eine weitere wichtige zusätzliche Thrombinquelle stellt der hohe Prothrombingehalt des Serums Hämophiler dar. Auch nach der üblichen zweistündigen Inaktivierung sind infolge der herabgesetzten "Prothrombin Consumption" in solchen Sera oft recht beträchtliche Prothrombinmengen zu messen. Gerade das Serum von Hämophilen wird im Thrombokinasebildungstest häufig zur Verwendung kommen. Das dadurch in verschiedener Menge ins System hineingebrachte Prothrombin wird durch die sich bildende Thrombokinase in Thrombin umgewandelt, und dieses wird sich bei der Bestimmung der Gerinnungszeit störend bemerkbar machen.

Diese Tatsachen veranlassten uns, das Ausmaß und die Bedeutung solcher, durch zusätzliches Thrombin entstehenden Fehler im Thrombokinasebildungstest festzustellen und einen Weg zu ihrer Vermeidung zu suchen.

In diesem Zusammenhang schien uns eine weitere Fragestellung von Interesse zu sein, welche von *Biggs*, *Douglas* und

Tabelle 1

Thrombin in Min.	Normal-Sera									
Gerinnungszeit	8	35	8	25	13	12	60	10	60	12
Prothrombin in % von Normalplasma	3,5	2,5	4	3,5	4	4	2,5	1,5	3,5	4
Thrombin in Min.	Dicumarol-Sera					Hämophilie-Sera				
Gerinnungszeit	>60	>60	>60	20	>60	20	1'40"	6	4	2
Prothrombin in % von Normalplasma	1,5	2	1,5	1,5	3	50	80	30	70	70

Thrombin (in Min. Gerinnungszeit mit Fibrinogen) und Prothrombin (in % von Normalplasma) verschiedener Sera nach 2 h Wasserbad bei 37° C.

Macfarlane (3) bereits berührt worden ist: Ob nämlich für die auto-katalytische Wirkung des Thrombins (21, 23, 25) neben anderen bereits beschriebenen Möglichkeiten auch eine beschleunigende Wirkung desselben auf die Thrombokinasebildung zur Erklärung herbeigezogen werden könne. Man machte bisher die proteolytische Aktivität des Thrombins für seine auto-katalytische Wirkung verantwortlich (13, 21). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergab die agglutinierende und lytische Wirkung von Thrombin auf die Thrombozyten (1). Ferner aktivieren Spuren von Thrombin den Faktor V (26), welcher seinerseits bei Gegenwart von Gewebs-Thrombokinase die Thrombinbildung beschleunigt. *Biggs, Douglas* und *Macfarlane* haben durch Thrombin-Beimischung zum Inkubationsgemisch in ihrem Test eine beschleunigende Wirkung von Thrombin auf die Thrombokinasebildung festgestellt. Wir konnten diese Ergebnisse bestätigen. Gegen solche Beimischungsversuche ist aber stets der Einwand zu erheben, daß wohl kaum Thrombinpräparate existieren, die nicht neben Thrombin einige andere gerinnungsaktive Stoffe enthalten, vor allem Faktor VII, und wohl auch IX und X, welche in einem solchen Präparat schwer nachzuweisen sind, sich aber doch störend bemerkbar machen. Es schien uns deshalb angebracht, dieser Frage auf anderem Wege weiter nachzugehen.

Methodik

1. *Thrombokinasebildungstest*: Modifikation nach *Duckert* und Mitarb. (10). Thrombozyten-Isolierung nach *Flückiger, Hässig* und *Koller* (12).

Um Ungenauigkeiten durch Umrechnen zu vermeiden, geben wir unsere Resultate als Gerinnungszeiten in Sekunden und Inkubationszeiten in Minuten an und stellen sie graphisch in Form einer Kurve dar. Die Normalwerte schwanken etwas von einer Reagentien-Serie zur andern. Direkte Vergleiche der Resultate stellen wir deshalb nur innerhalb einer Reagentien-Serie an.

2. *Prothrombin-Bestimmung*: Einstufen-Methode nach *Loeliger* (16).

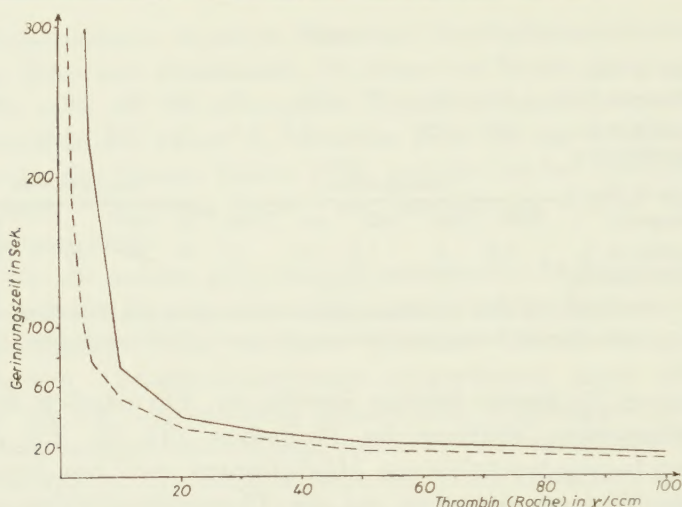


Abb. 1. Thrombinverdünnungskurve. Gerinnungszeiten gemessen mit decalcifiziertem Plasma (—) und mit Fibrinogen (---). Das verwendete Thrombin (Roche) enthält in 1 mg 50 *Mellanby*-Einheiten.

3. *Thrombin-Bestimmung*: Wir geben 0,1 ccm Serum oder Thrombin-Verdünnung zu 0,1 ccm einer 500 mg %igen Fibrinogen-Lösung (Rinder-Fibrinogen Roche, in 0,9 % NaCl). Bestimmung der Gerinnungszeit mit Platindraht und Stoppuhr.

Zur Herstellung der Thrombin-Verdünnungskurve (s. Abb. 1) verdünnten wir eine Thrombin-Stammlösung (10 mg Ochsen-Thrombin Roche = 500 *Mellanby*-Einheiten, in 5 ccm 70 %igem Glycerin) in verschiedenen Mengenverhältnissen mit Veronalacetat-Puffer (pH 7,36) im silikonisierten Röhrchen.

Bestimmung der Gerinnungszeit mit Fibrinogen-Lösung und mit Substratplasma. Für verschiedene Substratplasmen müssen jedesmal neue Verdünnungskurven angelegt werden.

1. Die Wirkung von Thrombin im Serum auf den Thrombokinasetest

Von der Beimischung eines Thrombin-Präparates zum Inkubationsgemisch sahen wir nach einigen Vorversuchen wieder ab, da wir feststellten, daß in dem Präparat eine Reihe anderer Gerinnungsfaktoren enthalten sind, welche die Wirkung des Thrombins unübersichtlich gestalten. Es schien uns zweckmäßiger, auf die Verwendung nicht genau erfaßbarer Gerinnungsfaktoren zu verzichten, und statt dessen zu versuchen, Variationen im Thrombingehalt durch Elimination des Thrombins aus dem Serum zu erreichen. Dies gelang uns dadurch, daß wir das Serum nach der üblichen Inaktivierung weitere zwei Stunden bei Zimmertemperatur intensivem Glaskontakt aussetzen. In ein Glasröhrchen füllten wir 0,2 ccm Serum und sorgten durch häufiges Bewegen für dauernde Benetzung der Innenfläche des Röhrchens. Auf diese Art wurde die thrombinadsorbierende Fähigkeit des Glases maximal ausgenützt und es gelang auch aus thrombinreichen Sera das Thrombin bis auf unmeßbare Spuren zu entfernen. Beispiele finden sich in Tab. 2.

Auch solche Sera, deren Thrombingehalt schon vor dieser Behandlung sehr klein war (z. B. Dicumarol-Sera), behandelten wir in der gleichen Weise, um für alle Sera die gleichen Bedingungen zu erhalten.

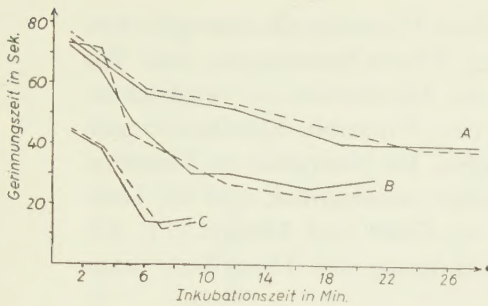


Abb. 2. Einfluß der Thrombin-Elimination aus dem Serum auf die Thrombokinasetest vor (—), nach (----) Thrombin-Elimination. Die Thrombinbestimmung ergab beim Dicumarol-Serum (A) vor und nach Elimination 60 Min., beim Hämophilie B-Serum (B) vorher 6 Min., nachher 60 Min., beim Normal-Serum (C) vorher 20 Min., nachher 60 Min.

Abb. 3. Mischungsversuch zum Nachweis von Faktor X vor (—) und nach (----) Thrombin-Elimination. Thrombinzeit im Dicumarol-Serum (A) vor- und nachher 60 Min., im Hämophilie B-Serum vorher 6 Min., nachher 60 Min. C: Gemisch der Sera A und B im Verhältnis 1 : 1.

Tabelle 2

Gerinnungszeiten von 0,1 ccm Serum mit 0,1 ccm Fibrinogen-Lösung			
Normale Sera		Sera von Hämophilen	
vor	nach	vor	nach
Thrombin-Elimination		Thrombin-Elimination	
22 Min.	> 60 min.	20 Min.	> 60 Min.
20 „	> 60 „	6 „	> 60 „
10 „	> 60 „	4 „	> 60 „
8 „	> 60 „	4 „	> 60 „
4 „	> 60 „	2 „	> 60 „
		1 „ 40 sec	> 60 „

Der Einfluß dieser Thrombin-Elimination auf die Thrombokinasetestfähigkeit verschiedener Sera zeigt Abb. 2.

Es geht daraus hervor, daß solche *Unterschiede im Thrombingehalt*, wie wir sie auf die beschriebene Weise produzieren konnten, und wie sie auch nach der üblichen Behandlung in verschiedenen Sera vorhanden sind, *auf die Thrombokinasetest keinen Einfluß* haben.

Als Grundversuch zum Nachweis des Faktors X geben Koller und Mitarb. (14, 15) den Mischungsversuch von Dicumarol-Serum mit Serum einer Hämophilie B an. Diese Mischung ergibt im Thrombokinasetest eine normale Kurve, während beide Sera allein deutlich pathologische Kurven ergeben. Da im Serum von Hämophilen häufig ausgesprochen viel, im Dicumarol-Serum dagegen fast immer ausgesprochen wenig Thrombin vorhanden ist,

schien es uns wichtig, gerade hier diese Unterschiede auszugleichen durch Elimination der restlichen Thrombinmengen, und das Mischungsresultat vor und nach der Elimination zu vergleichen. Abb. 3 zeigt, daß vor und nach der Thrombin-Elimination alle drei Kurven praktisch gleich verlaufen. *Der Unterschied im Thrombingehalt ist also für die Normalisierung nicht verantwortlich*, und die Deutung dieser Normalisierung, wie sie Koller und Mitarb. (14, 15) geben, erfährt durch die Berücksichtigung des Thrombins keine Änderung.

2. Die Wirkung des Prothrombins im Serum auf den Thrombokinasetest

Wenn im Inkubationsgemisch des Thrombokinasetestes Prothrombin vorhanden ist, findet neben der Thrombokinasenbildung auch eine Thrombinbildung statt. Die bei der Bestimmung der Gerinnungszeit wirksame Thrombinmenge setzt sich in diesem Falle aus zwei Anteilen verschiedener Herkunft zusammen: einerseits aus demjenigen Thrombin, welches erst im Moment der Bestimmung durch Einwirkung der Thrombokinasen auf das Prothrombin des Substratplasmas entsteht; und andererseits aus demjenigen Thrombin, welches schon während der vorausgehenden Inkubationszeit sich aus dem Serum-Prothrombin im Inkubationsgemisch gebildet hat. Die Proportionalität zur gesuchten Thrombokinasemenge besteht aber wegen der Inkonstanz des Serum-Prothrombins nur zum ersten dieser zwei Anteile, wird also durch den zweiten gestört. Wenn wir diesen zusätzlichen, störenden Thrombin-Anteil quantitativ erfassen könnten, wäre es möglich, durch dessen Subtraktion vom Gesamt-Thrombin den Fehler auszuschalten.

Zu diesem Zweck führten wir den Test drei Mal unmittelbar nacheinander mit den gleichen Reagentien aus. Als Substrat verwendeten wir beim ersten und dritten Mal das übliche decalcifizierte Plasma, beim zweiten Mal eine reine 500 mg %ige Fibrinogen-Lösung. Mit dem Fibrinogen erfassen wir den im Inkubationsgemisch entstehenden Thrombin-Anteil allein, und haben somit den Fehler quantitativ bestimmt. Die dritte, wieder mit Plasma als Substrat durchgeführte Bestimmungsreihe dient dazu, in der Zwischenzeit auftretende, spontane Aktivitätsschwankungen, wie wir sie gelegentlich beobachteten, festzustellen.

Mit Hilfe der Thrombin-Verdünnungskurven (Abb. 1) haben wir nun die Möglichkeit, die Subtraktion der zusätzlichen Thrombinmenge vom Gesamt-Thrombin durchzuführen. Auf rechnerischem Wege erhalten wir diejenige Thrombinmenge, welche unter dem Einfluß der zu messenden Thrombokinasen im Substrat entstanden ist, und für welche die gewünschte Proportionalität zwischen Gerinnungszeit und Thrombokinasemenge Gültigkeit hat.

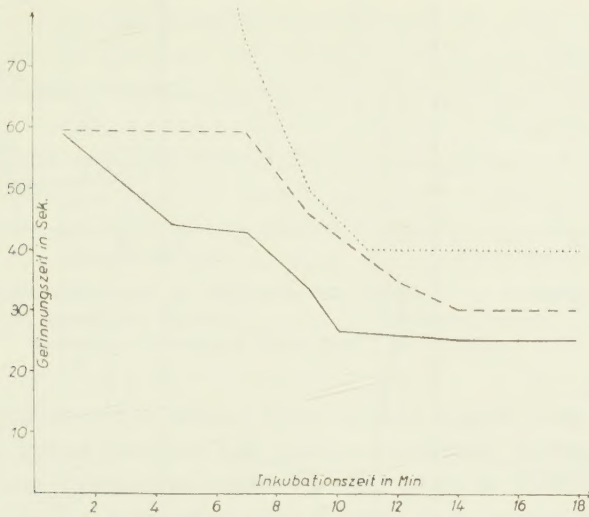


Abb. 4. Thrombokinasebildungskurve mit Serum von Hämophilie B. Gerinnungszeiten mit Plasma (—), mit Fibrinogen (....). Korrigierte Kurve (---). Prothrombin im Serum 80 %.

Beispiel der rechnerischen Korrektur der Kurve anhand des 9-Minuten-Wertes in Abb. 4: Mit Plasma als Substrat ergibt sich eine Gerinnungszeit von 34 sec. Ablesung an der Thrombin-Verdünnungskurve (Abb. 1) ergibt ein Gesamt-Thrombin von 28 γ . Mit Fibrinogen als Substrat ergibt sich eine Gerinnungszeit von 50 sec. Ablesung in Abb. 1 ergibt ein zusätzliches Thrombin von 10 γ . Die Differenz ergibt den korrigierten Thrombinwert: 18 γ . Die Ablesung in Abb. 1 ergibt die korrigierte Gerinnungszeit von 46 sec.

Mit dieser Methode untersuchten wir Sera mit verschiedenem Prothrombingehalt und mit verschiedener Thrombokinase-bildender Aktivität. Zu normalem und zu Dicumarol-Serum mischten wir verschiedene Mengen einer konzentrierten, reinen Lösung von menschlichem Prothrombin, das nach der Methode von Duckert, Koller und Matter (9) auf chromatographischem Wege isoliert wurde. Es enthält weder Thrombin, noch Faktoren V oder VII und ist, im Thrombokinasebildungstest an Stelle von Serum verwendet, inaktiv.

Wie Abb. 5 zeigt, muß zusätzliches Thrombin eine beträchtliche Aktivität erreichen, um einen meßbaren Einfluß auf die normale Thrombokinasebildungskurve ausüben zu können. Durch Subtraktion des zusätzlichen Thrombins erreicht man die ursprüngliche Kurve.

Abb. 6 zeigt, daß schon kleine zusätzliche Thrombinmengen genügen, um auf die pathologische Thrombokinasebildungskurve eines Dicumarol-Serums einen deutlichen Einfluß zu haben. Bei Zugabe großer Prothrombinmengen (c) wird wegen der geringen Thrombokinase-Aktivität erst nach längerer Inkubationszeit das Maximum

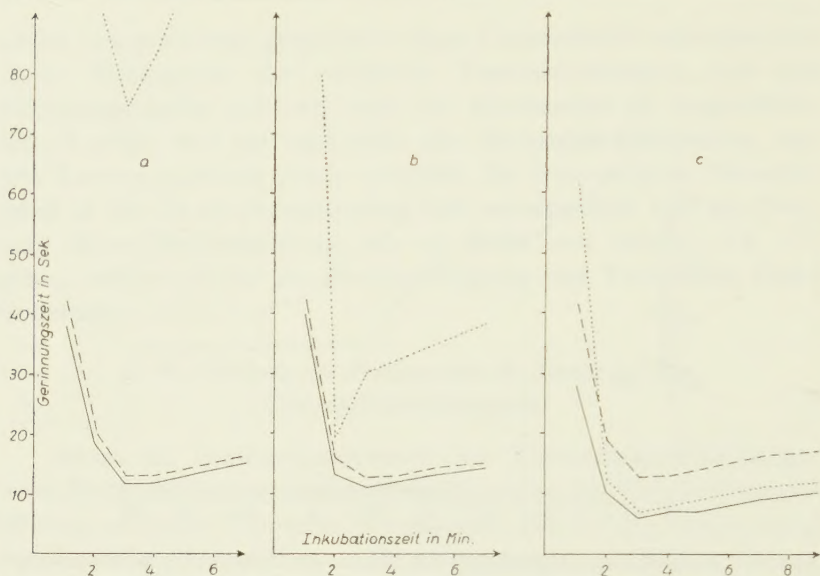


Abb. 5. Thrombokinasetest mit prothrombinreichem Normal-Serum. a: vor Beimischung von Prothrombin (Prothrombin 1,5 %); b: Anreicherung auf 25 % Prothrombin; c: Anreicherung auf 100 % Prothrombin. Gerinnungszeiten mit Plasma (—), mit Fibrinogen (.....). Korrigierte Kurven (----).

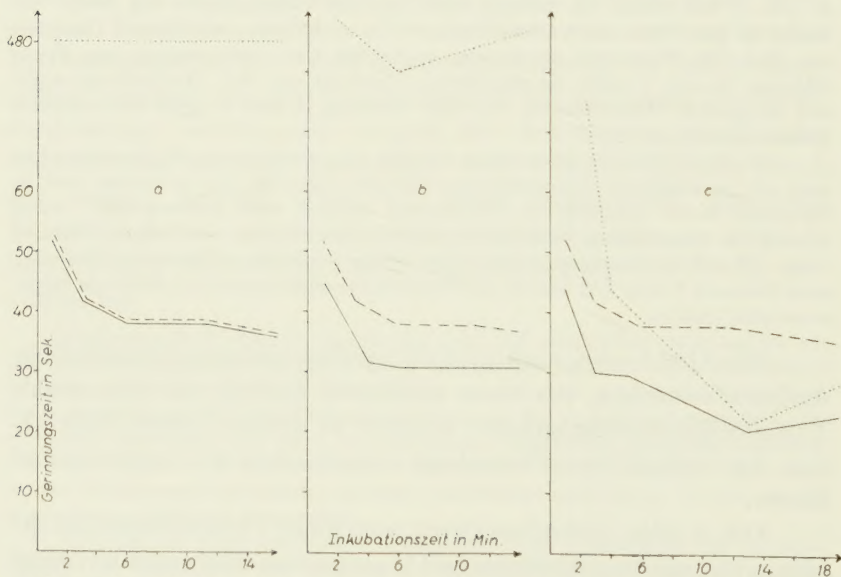


Abb. 6. Thrombokinasetest mit prothrombinreichem Dicumarol-Serum. a: vor Beimischung von Prothrombin (Prothrombin 1,5 %); b: Anreicherung auf 7 % Prothrombin; c: Anreicherung auf 100 % Prothrombin. Gerinnungszeiten mit Plasma (—), mit Fibrinogen (.....). Korrigierte Kurven (----).

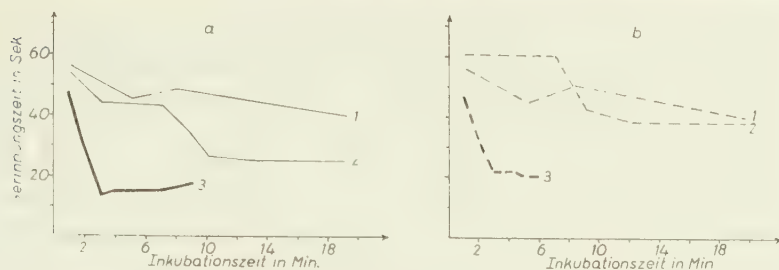


Abb. 7. Mischungsversuch zu Nachweis von Faktor X. a: unkorrigierte Kurven (—); b: korrigierte Kurven (---). 1: Dicumarol-Serum; 2: Hämophilie-B-Serum; 3: Gemisch von 1 und 2 im Verhältnis 1:1.

des zusätzlichen Thrombins erreicht. Die Kurve wird daher vor allem in ihrem zweiten Teil stärker beeinflusst. Subtraktion des zusätzlichen Thrombins ergibt die ursprüngliche Kurve.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Thrombin, welches gleichzeitig mit Thrombokinasen im Thrombokinasetest entsteht, den einfachen Regeln gehorcht, die sich aus der Thrombin-Verdünnungskurve ergeben. Seine Wirkung ist also rein additiv. Es wirkt nicht beschleunigend auf die Thrombokinasenbildung.

Zuletzt interessierte es uns, den Mischungsversuch mit Dicumarol- und Hämophilie-B-Serum, den Koller und Mitarb. (14, 15) zum Nachweis des Faktors X heranziehen, mit unserer Methode zu wiederholen. Es wäre naheliegend, wenigstens einen Teil der normalisierenden Wirkung des Hämophilie-B-Serums auf das Dicumarol-Serum dem hohen Prothrombingehalt des ersteren zuzuschreiben. Bei Berücksichtigung unserer oben dargestellten Befunde, die eine rein additive Wirkung des zusätzlichen Thrombins nachweisen, erwarten wir allerdings auch in dieser Versuchsanordnung keine wesentlich neuen Resultate.

Wir führten den Mischungsversuch wie oben beschrieben einerseits mit Plasma, andererseits mit Fibrinogen als Substrat aus, subtrahierten das zusätzliche Thrombin vom Gesamt-Thrombin, und stellten die auf diese Weise erhaltenen Kurven den ursprünglichen gegenüber.

Aus Abb. 7 wird sichtbar, daß im korrigierten System (b) die Werte des prothrombinreichen Hämophilie-B-Serums und diejenigen der Mischung deutlich höher liegen als im unkorrigierten System (a). Dieser Unterschied entspricht den Regeln der Thrombin-Addition. Die Unterschiede zwischen den Einzelsera und der Mischung, und damit das Phänomen der Normalisierung, bleiben aber erhalten. Die Deutung dieser Normalisierung, wie sie Koller

und Mitarb. (14, 15) durch die Annahme eines neuen Faktors (Faktor X) geben, erfährt also durch die Berücksichtigung des Thrombins keine Änderung. Erklärt wird aber unsere Beobachtung, wonach im Mischungsversuch oft Werte gemessen werden können, die bezüglich der Thrombokinase-Aktivität höher lagen als diejenigen eines Normal-Serums. Solche «Über-Normalisierungen» sind durch die zusätzliche Thrombinmenge bedingt und nicht durch über-normale Thrombokinase-Aktivität.

Diskussion

Auf der Suche nach Fehlerquellen im Thrombokinasebildungstest fielen uns die Unterschiede im Thrombin- und Prothrombingehalt der verschiedenen zu untersuchenden Sera auf. Die praktische Frage nach dem Einfluß dieser Unterschiede auf die Resultate des Tests läßt sich durch die hier beschriebenen Versuche beantworten.

Die Unterschiede im *Thrombingehalt* verschiedener Sera haben auf die Thrombokinasebildung keinen Einfluß. Diese Thrombinmengen sind zu klein, um meßbare Verkürzungen der Gerinnungszeiten zu bewirken. Die bisher übliche Vorbehandlung des Serums (2 h Wasserbad bei 37°C) genügt also zur Herabsetzung des Thrombingehaltes auf unwirksame Mengen.

Etwas anders verhält es sich mit dem unterschiedlichen *Prothrombingehalt* verschiedener Sera. Bei Verwendung prothrombinreicher Sera (z. B. von Hämophilen) entstehen im Inkubationsgemisch des Tests ganz beträchtliche Mengen Thrombin. Dadurch werden die Gerinnungszeiten verkürzt. Indem wir einem Serum von bekannter Thrombokinase-bildender Aktivität reines Prothrombin zusetzen und die daraus entstehenden Thrombinmengen nach den Regeln der Thrombin-Verdünnungskurve von der Gesamtheit des wirksamen Thrombins subtrahieren, erhalten wir die ursprüngliche Thrombokinasebildungskurve wieder zurück. Diese Tatsache läßt auf rein additive Wirkung des Thrombins schließen. Eine beschleunigende Wirkung auf die Thrombokinasebildung scheint Thrombin nicht zu haben.

Die Tatsache der rein additiven Thrombinwirkung ermöglicht es uns, auf einfache Art den durch zusätzliches Thrombin in unserem Test entstehenden Fehler zu korrigieren. Beim Vergleich solcher korrigierter Kurven mit unkorrigierten zeigt es sich, daß die

Fehler in gewissen Fällen recht beträchtlich sind, daß aber eigentliche Fehldeutungen von Resultaten nicht zustande kommen. Schwierigkeiten ergeben sich vor allem bei der Diagnose der Hämophilie B mit unserem Test. Bei Verwendung eines Serums von Hämophilie B mit ausgesprochen hohem Prothrombingehalt (d. h. mit sehr stark pathologischer «Prothrombin Consumption») resultieren Kurven, die dem Normalwert bedeutend näher liegen als solche eines prothrombinarmen Hämophilie-B-Serums (mit schwach pathologischer «Prothrombin Consumption»). Das viele zusätzliche Thrombin ist also im Stande, aus einer pathologischen Kurve eine annähernd normale zu machen, und so die richtigen quantitativen Verhältnisse des Faktors IX zu verschleiern. Ein gültiger Vergleich quantitativer Art zwischen pathologischen und normalen Sera wird so verunmöglicht. Erst durch die Berücksichtigung des Thrombins mit der angegebenen Methode kommen die wirklichen Unterschiede zum Vorschein. (s. Abb. 4).

Die Berücksichtigung der Thrombin-Verhältnisse scheint uns in allen Fällen notwendig, wo ein Serum mit pathologischer «Prothrombin Consumption» (Hämophilie A und B, Thrombopenie, Thrombopathie) im Thrombokinasebildungstest untersucht werden soll. Zu diesem Zweck muß im Anschluß an den üblichen Test ein zweites Inkubationsgemisch mit gleichen Reagentien hergestellt werden. Diesmal wird aber die Gerinnungszeit mit einer Fibrinogen-Lösung an Stelle von Substratplasma bestimmt. Anhand von Thrombin-Verdünnungskurven wird das mit Fibrinogen erfaßte Thrombin von dem mit Plasma erfaßten Thrombin subtrahiert. Für jede Inkubationszeit ergibt sich so eine neue, kleinere Thrombinmenge. Auf der Thrombin-Verdünnungskurve kann die dazugehörige, korrigierte Gerinnungszeit abgelesen werden. Durch dieses Vorgehen wird die Leistungsfähigkeit des Thrombokinasebildungstests, besonders wenn auf quantitative Untersuchung Wert gelegt wird, erhöht.

Es lag für uns nahe, den Versuch zum Nachweis des Faktors X (14, 15) unter Berücksichtigung der Thrombinverhältnisse zu wiederholen. Die Normalisierung von Dicumarol- und Hämophilie-B-Serum war auch nach der Korrektur deutlich, wenn auch gewisse «Über-Normalisierungen» dem Prothrombingehalt des Hämophilie-B-Serums zugeschrieben werden müssen.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß wir die Resultate von *Biggs*, *Douglas* und *Macfarlane* (3), wonach Thrombin einen

beschleunigenden Effekt auf die Thrombokinasbildung haben soll, auf die Unreinheit der Thrombin-Präparate zurückführen. Das von uns verwendete Prothrombin ist frei von anderen Gerinnungsfaktoren und dürfte das reinste bisher hergestellte Prothrombin darstellen. Unsere damit erreichten Resultate lassen die Annahme einer beschleunigenden Wirkung von Thrombin auf die Thrombokinasbildung nicht zu. Die anderen, bereits oben erwähnten Möglichkeiten, die autokatalytische Thrombinwirkung zu erklären, scheinen uns zu genügen.

Zusammenfassung

1. Nach einer kurzen Einführung in das Wesen des Thrombokinasbildungstests von *Biggs* und *Douglas* und seiner Modifikation nach *Duckert* und Mitarb. wird auf Fehlermöglichkeiten durch Thrombin aufmerksam gemacht.

2. In verschiedenen Sera sind nach der üblichen Vorbehandlung noch beträchtliche Unterschiede des Thrombingehaltes vorhanden. Durch Adsorption von Thrombin an Glas können diese Unterschiede aufgehoben werden, wobei die Thrombokinasbildende Aktivität des Serums keine Veränderung erfährt.

3. Bei Verwendung von Serum Hämphiler gelangen große Mengen Prothrombin ins Inkubationsgemisch, woraus unter Einwirkung sich bildender Thrombokinas beträchtliche Thrombinmengen entstehen. Die auf diese Art zustandekommende Verkürzung der Gerinnungszeiten kann als rein additive Wirkung von Thrombin erklärt werden. Damit wird eine beschleunigende Wirkung von Thrombin auf die Thrombokinasbildung ausgeschlossen. Es wird vorgeschlagen, bei Verwendung von Sera mit pathologischer «Prothrombin-Consumption» den Thrombokinasbildungstest durch die angegebene Methode zu ergänzen und so die Bildung zusätzlichen Thrombins zu berücksichtigen.

4. Die Versuche von *Koller* und Mitarb. zum Nachweis des Faktors X werden wiederholt und ergeben auch bei Berücksichtigung der Thrombin-Wirkung prinzipiell gleiche Resultate.

Summary

1. After a short introduction into the principle of *Biggs'* and *Douglas'* thromboplastin generation test and its modification according to *Duckert* and coll., the author points out the possibility of errors due to thrombin.

2. Following the usual preliminary treatment various sera still show considerable differences in their thrombin content. These differences can be removed by the adsorption of thrombin on glass, whereby the thromboplastin forming property of the serum remains unaffected.

3. When haemophilic serum is used large quantities of prothrombin reach the incubation mixture. The formation of considerable quantities of thrombin out of this is encouraged by the growing thrombokinas. The resulting shortening of the coagulation time can be explained as being a purely additive effect of thrombin. A hastening effect of thrombin on the formation of thrombokinas is thus excluded. When sera with pathological "prothrombin consumption" are being employed, the author suggests that the thromboplastin generation test be supplemented by the method described so that the formation of additional thrombin may be taken into account.

4. The author repeats the experiments made by *Koller* and coll. to prove the presence of factor X. Taking into account the effect of thrombin, he reaches basically similar results.

Résumé

1. Après avoir exposé brièvement le principe du test de formation de la thrombokinasase de *Biggs* et *Douglas*, et de sa modification par *Duckert* et ses collaborateurs, l'auteur attire l'attention sur les possibilités d'erreur dues à la thrombine.

2. Différents sérums, après la préparation habituelle, présentent encore des variations importantes de leur teneur en thrombine. L'adsorption de la thrombine par le verre peut supprimer ces variations sans modifier l'activité thrombokinasique du sérum.

3. Lorsqu'on utilise du sérum d'hémophile, de grandes quantités de prothrombine parviennent dans le mélange d'incubation. La thrombokinasase naissante entraîne la formation de quantités notables de thrombine, qui peuvent, par simple action additive, expliquer le raccourcissement des temps de coagulation observé. Une action accélérante de la thrombine sur la formation de la thromboplastine est exclue. Lors de l'emploi de sérums ayant une consommation de prothrombine pathologique, il est conseillé de compléter le test de formation de thromboplastine par la méthode décrite, pour tenir compte ainsi de la formation de thrombine additionnelle.

4. L'auteur a répété les expériences de *Koller* et de ses collaborateurs pour mettre en évidence le facteur X. Il obtient, en tenant compte de l'action de la thrombine, des résultats sensiblement identiques.

Literatur

1. *Baserga, A.* und *P. de Nicola*: C. R. 3e Congr. Soc. Europ. Hémat. Rom 1952. —
2. *Biggs, R.* und *A. S. Douglas*: J. clin. Path. 6, 23, 1953. — 3. *Biggs, R., A. S. Douglas* und *R. G. Macfarlane*: J. Physiol. 119, 89, 1953. — 4. *Biggs, R., A. S. Douglas, R. G. Macfarlane, J. V. Dacie, L. R. Pitney, G. Merskey* und *J. R. O'Brien*: Brit. med. J. 2, 1378, 1952. — 5. *Biggs, R.* und *R. G. Macfarlane*: Human Blood Coagulation and its Disorders. Blackwell Scientific Publ., Oxford 1953. — 6. *Brinkhous, K. M.*: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 66, 117, 1947. — 7. *Collingwood, B. J.* und *M. T. MacMahon*: J. Physiol. 45, 119, 1912. — 8. *Cramer, R., M. Matter* und *A. Loeliger*: Helv. paediat. Acta 8, 185, 1953. — 9. *Duckert, F., F. Koller* und *M. Matter*: Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 82, 259, 1953. — 10. *Duckert, F.* und Mitarb.: Acta haemat. 12, 197, 1954. — 11. *Ferguson, J. H.*: 2nd Conf. Josiah Macy Jr. Found. 1949, 211. — 12. *Flückiger, P., A. Hässig* und *F. Koller*: Schweiz. med. Wschr. 83, 1035, 1953. — 13. *Guest, M. M.* und *A. G. Ware*: Science 112, 21, 1950 (zit. 21). — 14. *Koller, F.*: Arch. exp. Path. Pharmacol. 1954, (im Druck). — 15. *Koller, F.*: in Vorbereitung. — 16. *Loeliger A.*: Wien. Z. inn. Med. 3, 169, 1952. — 17. *Macfarlane, R. G.*: Proc. roy. Soc. Med. 35, 410, 1942. — 18. *Macfarlane, R. G.* und *R. Biggs*: J. clin. Path. 6, 3, 1953. — 19. *Mellanby, J.*: J. Physiol. 38, 28, 1909. — 20. *Quick, A. J.*: Amer. J. med. Sci. 214, 272, 1947. — 21. *Schultze, H. E.* und *G. Schwick*: Hoppe-Seyler's Z. 289, 26, 1951. — 22. *Seegers, W. H.*: 4th Conf. Josiah Macey Found., 1951, 157. — 23. *Seegers, W. H., R. L. McClaughry* und *J. L. Fahey*: Blood 5, 421, 1950. — 24. *Shinowara, G. Y.*: J. Lab. clin. Med. 38, 11, 1951. — 25. *Stefanini, M.*: Acta med. scand. 140, 290, 1951. — 26. *Ware, A. G.* und *W. H. Seegers*: J. biol. Chem. 174, 565, 1948 (zit. 1).

